

アセトニトリルの生体作用

—他種のニトリル類との作用の比較—

金沢大学医学部衛生学講座 (主任: 橋本和夫教授)

松 木 光 子

(平成3年6月20日受付)

アセトニトリル (acetonitrile, CH_3CN) の毒性作用とその機序を明らかにするために、マウス、ラットおよび培養神経細胞を用いて検討した。マウスおよびラットに体重当たり同等量のアセトニトリルを1回経口投与後、血中のシアン量はマウスではラットの約10倍であった。ラットに $[1\text{-}^{14}\text{C}]$ アセトニトリルを1回腹腔内投与後の放射能は血液、腎、肝、肺に最も多く、次いで、精巣、大脳、小脳、脊髄などに多く検出された。いずれの組織でも放射能はトリクロル酢酸可溶性分画に多く、蛋白分画には僅かに検出された。両分画中の放射能は、投与後7日目で24時間後の約1/5に減少した。 $[^{14}\text{C}]$ アセトニトリルを7日間、連日繰り返し腹腔内投与した後の、放射能の分布および時間経過は、1回投与時と類似し、組織内での蓄積性は認められなかった。マウスニューロblastoma細胞 N18TG-2 の増殖に対するアセトニトリルの50%阻害濃度 (ED_{50}) は、17.8mM (95%信頼区間16.7~19.0mM) であった。ラットグリオーマ細胞 C6 に対する ED_{50} は 20mM 以上であった。比較に用いた脂肪族ニトリル化合物中、クロロアセトニトリルは N18TG-2 細胞、および C6 細胞に対して ED_{50} が1.53mM および0.5mM と最も強い阻害作用を示した。アセトニトリルは N18TG-2 細胞のグルコース代謝を増大させたが、蛋白代謝には影響を与えなかった。アセトニトリルを含む9種の脂肪族ニトリル類の油-水分配係数 ($\log P$) と N18TG-2 細胞阻害作用の逆数 $\log (1/\text{ED}_{50})$ との回帰分析で $\log P 0.2$ を頂点とする3次の関係が得られた。

Key words acetonitrile, toxicity, animals, neural cell cultures, mechanism

アセトニトリル (CH_3CN) は、極性が高く、水、アルコール類ともよく混合するすぐれた溶剤で、各種有機化合物、とくに脂質類の抽出溶剤、石油分留物の分離剤、各種有機合成の原料、液体クロマトグラフィーの溶出剤などとして、広く用いられている。また、近年は、DNA 合成、ペプチド結合剤などとして生物工学分野での利用が拡大している¹⁾²⁾。

一方、アセトニトリルは皮膚接触、蒸気吸入、誤飲などで急性中毒をおこすことが知られている。アセトニトリルのこの中毒作用については、他の各種有機ニトリル類に比較して弱い³⁾とはいえ、ニトリル類一般に共通する生体内でのシアン基 (青酸基) の遊離によ

る、急性シアン中毒によるものとする考えが一般的である³⁾。これは、人間のアセトニトリル急性中毒例における血液および尿中での遊離シアンの検出と、チオシアン (ロダゲン) 量増加の証明、およびラット、イヌ、サルなどにおけるアセトニトリル蒸気曝露時にみられる同様の現象によって示されている³⁾⁴⁾。また、最近四塩化炭素前処理ラットでアセトニトリルの急性毒性が著明に減少すること⁵⁾、アセトニトリルやエタノール前処理では逆にアセトニトリルの毒性が高まること⁶⁾⁷⁾などが報告されている。これは、四塩化炭素前処理では、肝ミクロゾーム薬物代謝酵素系の阻害により、アセトニトリルからのシアン遊離が抑えられ、一方エタ

Abbreviations: protein fraction, protein; trichloroacetic acid soluble fraction, TCA; 油-水分配係数, $\log P$; 50%阻害濃度, ED_{50} : 除蛋白操作後沈渣, 蛋白分画; 2%トリクロル酢酸除蛋白上清, 酸溶性分画

ノールやアセトンはこの酵素系を誘導して、シアンの遊離を促進するためと解釈されている。

しかし、アセトニトリルの毒性作用に関して、なおいくつかの疑問点が残されている。それを列挙すると、1) 動物による感受性の差、2) 急性症状および中毒死の原因と遊離シアンとの関係、3) アセトニトリルの生体内分布、4) アセトニトリルの神経毒性、などの問題点がある。

今回、著者は、アセトニトリルの毒性に関するこれらの疑問点を明らかにし、また、アセトニトリルを取り扱う産業現場での健康管理の基礎となる知見を得る目的で、以下の研究をおこなった。すなわち、アセトニトリルに対する動物の感受性の差と遊離シアンとの関係、アセトニトリルの体内分布、および培養神経細胞の増殖に対する作用などを指標としたアセトニトリルの神経障害作用をしらべ、これを他の脂肪族ニトリル類の作用と比較した。また、とくにニューロブラストーマ細胞に対する作用機序を知るため、増殖への影響と油-水分配率との関係を検討した。

材料および方法

I. 化学薬品

1. アセトニトリルおよびその他の試薬

アセトニトリルは高速液体クロマトグラフ用(和光純薬、大阪)を用いた。比較に用いたニトリル類は、アクリロ、プロピオ、3-ヒドロキシプロピオ、n-ブチロ、アリル、クロロアセト、3-クロロプロピオ、イソブチロおよびメタクリトニトリルで、すべて試薬特級(東京化成工業、東京)を用いた。その他の試薬はすべて試薬特級品を用いた。

2. 放射性アセトニトリル

比放射能 55mCi/mmol, 放射化学的純度97%および化学的純度99%の [^{14}C] アセトニトリル (アマーシャム・インターナショナル, Amersham, England) を用いた。

II. 実験動物

近交系 Wistar 雄ラット (5 週齢) および近交系 ddY 雄マウス (5 週齢) を、静岡実験動物共同組合 (静岡) より入手した。体重がラットで約 200g, マウスで約 25g に成長するまで飼育して実験に供した。飼育室は気温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 気湿 $65 \pm 10\%$, 12/12 時間の明暗サイクルとした。飼育期間中は固形飼料 (オリエンタル、東京) と水を自由に与えた。

III. 動物処理法

1. アセトニトリル

アセトニトリルを 5% (W/W) の水溶液とし、

500mg/kg 体重の割合で 1 回経口投与した。

2. 放射性アセトニトリル

放射性アセトニトリル原液をアセトニトリルで希釈したのち、0.2~1% (W/V) の水溶液とし、1 回投与の場合は、20, 50 および 100mg/kg 体重の割合で、また繰り返し投与の場合は、同上水溶液を 20mg/kg 体重の割合で 7 日間連続して、いずれもラットの腹腔内に投与した。ラット 1 匹当たりの投与放射線量は、1 回および繰り返し投与いずれも 20mCi (640KBq)/200g 体重とした。

IV. 生体試料の調製

アセトニトリル投与後、各種時間に動物をバントバルビタール・ナトリウム麻酔下に開胸し、ヘパリン処理注射器で右心房より血液を十分採取した。同時に各種臓器を摘出し、0.2M 磷酸緩衝液 (pH7.4) で 20% のホモジェネートとし、アセトニトリルおよびシアン量の測定に用いた。また放射能の測定には、同上のホモジェネートに 1/4 容の 10% トリクロル酢酸を加えて遠心、除蛋白し、得られた沈渣を再度 2% トリクロル酢酸で洗浄し、2 度の上清を合わせた。

V. 生体試料の測定

1. アセトニトリルおよびシアン

血液、または大脳および肝臓の 20% ホモジェネートに 0.4N 過塩素酸溶液を加えて遠心し、得られた除蛋白上清を 2N 炭酸カリウム液で中和した。血液ではこの操作を 2 回繰り返しておこなった。得られた試料液をガスクロマトグラフに注入してアセトニトリルを定量した。ガスクロマトグラフのカラムは ProrapakQ 1m, 175-195°C の昇温条件で測定した。組織中のシアンの定量は既知の方法⁹⁾に従った。

2. 放射能

各種生体試料中、血清、組織の 2% トリクロル酢酸除蛋白上清 (酸溶性分画) および尿は、バイアル瓶中に約 0.5ml を秤量し、液体シンチレーションカウンター (LCS1000, アロカ、東京) で放射能を計測した。全血、および臓器の除蛋白操作後沈渣 (蛋白分画) については、常温で一昼夜乾燥後、約 0.5g を秤量し、自動試料燃焼装置 (ASC113, アロカ) にて [^{14}C] を [$^{14}\text{CO}_2$] とし、液体シンチレーターに吸収させたのち、液体シンチレーションカウンターで計測した。計測値はすべて各臓器の単位重量当たりアセトニトリル投与量に対する百分率で示した。

VI. 培養神経細胞および培地

マウスのニューロブラストーマ N18TG-2 細胞およびラットのグリオーマ C6 細胞を、金沢大学医学部神経情報研究施設神経物性研究部門より譲り受けた。培

地は Dulbecco's modified Eaglemedium (GIBCO社, California, USA) に 5% 仔牛血清 (GIBCO社), 100単位/ml のペニシリン・ストレプトマイシン (GIBCO社) を加えたものを用いた。

VII. 培養神経細胞のアセトニトリルへの曝露

N18TG-2 および C6 細胞を, 細胞密度 0.5×10^4 cells/ml で 60mm のプラスチックディッシュ (Falcon社, New York, USA) にまいた。これにアセトニトリルまたは他のニトリルを, 最終濃度が 0 ~ 20mM の範囲内で, 予備実験で求めた 5 段階の濃度で加え, 37°C, 10% CO₂ 存在下で 6 日間培養した。水溶性の低い 3-クロロプロピオ, イソピチロおよびメタクリロニトリルについてはジメチルスルホキシド (和光純薬) に溶かしたのち添加した。これらの場合ジメチルスルホキシドのみを添加したものを溶媒対照とした。

VIII. 50%阻害濃度 (ED₅₀) の測定

アセトニトリルおよびニトリル類への曝露 6 日後, トリパンブルー染色法により培養細胞数を計数し, ニトリルの各濃度における細胞の生存率 (%) を求めた。生存率をプロビット変換したのち, 最小 2 乗法で一次回帰式を求め, プロビット値が 5.0 となる濃度を算出して, これを ED₅₀ とした。

IX. 培養細胞のグルコースおよび蛋白量の定量

グルコース濃度は, グルコース・キット (オートパック A・グルコース, ベーリンガー・マンハイム社, マンハイム, 独) を用いて測定した。蛋白濃度は Lowry 法⁹ により, 牛血清アルブミン (96~99%) (SIGMA社, St. Louis, USA) を標準として測定した。

X. 培養液中のシアンの定量

N18TG-2 細胞をアセトニトリルに曝露させた場合についてのみ, 培養液中のシアンの濃度を Epstein 法⁹ によって測定した。

XI. n-オクタノール-水分分配係数

既報の Tani & Hashimoto⁹ のデータを用いた。

XII. 培養細胞の走査電子顕微鏡による観察

カルノウスキー固定, 2% 四酸化オスミウム後固定および凍結乾燥の後, 金蒸着し, S-450 型走査電顕 (日立, 東京) にて観察した。

XIII. 統計学的検定法

得られた測定値は平均値±標準偏差で示した。2 群間の平均値の差の検定は Student 又は Welch の t 検定によった (両側検定)。p < 0.05 を有意とした。

成 績

I. アセトニトリル 1 回投与時の生体内アセトニトリルおよびシアンの分布

マウスとラットで見られるアセトニトリルの急性毒性の相違とその原因を明らかにする目的で, 各動物にマウスでの経口 LD₅₀ の約 2 倍量に相当する 500mg/kg 体重のアセトニトリルを 1 回経口投与した。投与 1 時間後に, とくにマウスにおいて浅く速い呼吸, 横臥状態, 軽度の痙攣などの中毒症状が見られた時点で血液, 大脳および肝臓中のアセトニトリルとシアン量を測定した。成績を表 1 に示す。アセトニトリルの濃度はマウス, ラットともに血液中で最も高く, 大脳および肝臓では血液の約 60% の値を示した。一方, シアンはマウスではラットに比べて血液中で約 10 倍量が検出された。大脳および肝臓では, マウス, ラットともに今回用いた測定法の定量限界 (0.1mg/g 組織) 以下であった。

II. [¹⁴C]-アセトニトリルの体内分布

アセトニトリルの生体内分布とその時間経過を知るために, ラットに [¹⁴C]-アセトニトリルを 1 回腹腔内投与したのちの放射能の分布を調べた。表 2 には 20, 50, 100mg/kg 投与後 24 時間の, 各臓器中の放射

Table 1. Concentration of acetonitrile and cyanide in blood, brain and liver 1 hr after oral administration of acetonitrile in mice and rats

		Acetonitrile $\mu\text{g/g}$ tissue	Cyanide $\mu\text{g/g}$ tissue
Mice (5) ^a	whole blood	0.427 ± 0.079^b	2.38 ± 0.49
	cerebrum	0.270 ± 0.033	n.d. ^c
	liver	0.268 ± 0.032	n.d.
Rat (5)	whole blood	0.476 ± 0.023	0.259 ± 0.105^d
	cerebrum	0.287 ± 0.021	n.d.
	liver	0.258 ± 0.020	n.d.

Mice and rats were dosed orally with 500 mg/kg of 5% acetonitrile in water and sacrificed after 1 hr when animals showed symptoms of acute intoxication such as rapid and irregular respirations, immobilization, and somnolence. ^anumber of animals, ^bmean±SD, ^cnot detected, ^dp < 0.01 v.s. the value obtained in mice blood by Welch's t-test (two sided). Neither acetonitrile nor cyanide was detected in control animals.

能量を酸溶性分画と蛋白分画に分けて測定した結果を示した。酸溶性分画は投与量に拘わらず血液、腎、肺、肝、精巣などで高い値を示した。蛋白分画も同様の傾向を示したが、酸溶性分画に比べて1/10またはそれ以下であった。表3は、アセトニトリル 20mg/kgの投与後30分、4時間、4日および7日目までの放射能の経時変化を示す。血液中放射能は30分後で最も高く、その後急速に減少した。各臓器中の放射能は4

時間後までの僅かに上昇し、その後減少した。1週間後には、24時間後の値(表2)に比べて約5分の1まで低下した。表4は20mg/kgのアセトニトリルを1日1回、7日間腹腔内投与したのち、7日目の放射能分布を示す。先に示した1回投与後7日目の放射能と比べて血清以外では有意差が認められなかった。

III. アセトニトリルの N18TG-2 および C6 細胞への作用

Table 2. Level of radioactivity in tissues 24 hr after a single ip administration of [^{14}C]acetonitrile at 20, 50 and 100mg/kg to rats

	Percent dose of administration per g body weight					
	20 mg/kg		50 mg/kg		100 mg/kg	
	TCA ^a	Protein ^b	TCA	Protein	TCA	Protein
Blood	55.2±20.4	14.9 ±9.1	15.7±7.8 ^d	3.4±0.11	7.6±0.44	2.1±0.25
Serum	36.5±7.2	4.1 ±1.4	24.3±13.9	0.74±0.13	19.4±3.3	0.69±0.20
Lung	38.2±19.0	1.2 ±0.56	10.3±3.7	1.5±0.06	7.5±3.9	0.98±0.19
Liver	33.5±12.3	1.9 ±0.45	10.6±4.9	2.2±0.08	5.8±0.42	2.6±0.33
Kidney	42.1±17.8	1.8 ±0.56	26.2±13.2	2.8±0.01	20.6±1.6	1.7±0.36
Testis	34.3±15.6	0.40±0.06	3.1±0.71	0.61±0.14	2.7±0.55	0.42±0.10
Cerebrum	15.7±8.7	0.23±0.09	4.4±0.43	0.48±0.05	4.4±1.8	0.32±0.07
Cerebellum	15.4±10.2	0.15±0.06	4.6±1.4	0.33±0.01	3.0±0.21	0.31±0.05
Spinal cord	12.8±8.2	0.31±0.06	6.4±4.1	0.42±0.07	2.6±1.7	0.44±0.22
Muscle	20.8±11.0	0.33±0.04	5.0±2.1	3.2±0.60	4.9±2.0	0.61±0.08

Twenty-four hrs after intraperitoneal administration of 20, 50 and 100mg/kg of [^{14}C] acetonitrile, the radioactivities in TCA-soluble and protein fractions of tissues were determined. ^a Trichloroacetic acid soluble fraction, ^b protein fraction, ^c 0.269±0.010 μmol (mean±SD), ^d 0.191±0.095 μmol , ^e 0.185±0.011 μmol .

Table 3. Level and time course of radioactivity in tissues after a single ip administration of [^{14}C] acetonitrile to rat

	Percent dose of administration per g body weight							
	30 min		4 hrs		4 days		7 days	
	TCA ^a	Protein ^b	TCA	Protein	TCA	Protein	TCA	Protein
Blood	498.9±356.4 ^c	nd ^d	179.6±24.8	7.7±1.4	17.4±1.3	8.1±1.3	7.3±3.3	5.2±3.1
Serum	236.3±8.5	nd	268.0±32.9	0.74±0.18	14.1±6.4	0.29±0.04	9.9±2.5	0.20±0.07
Lung	47.4±2.9	nd	84.5±11.8	1.4±0.26	13.5±1.1	0.83±0.05	7.0±3.7	1.3±1.1
Liver	83.7±14.2	nd	103.0±8.5	1.5±0.50	8.9±0.77	0.93±0.04	4.0±0.81	1.3±0.63
Kidney	80.8±15.5	nd	112.5±31.0	1.7±0.27	11.4±2.1	1.0±0.22	5.2±1.8	0.58±0.54
Testis	88.0±9.3	nd	104.8±36.8	0.34±0.04	8.2±0.93	0.20±0.08	3.4±2.0	0.24±0.05
Cerebrum	62.0±10.5	nd	94.7±21.5	0.24±0.06	0.74±0.11	0.23±0.06	0.4±0.05	0.16±0.06
Cerebellum	70.0±21.9	nd	92.4±21.0	0.27±0.06	0.70±0.39	0.13±0.06	0.2±0.36	0.12±0.04
Spinal cord	63.4±4.2	nd	81.7±37.8	0.25±0.08	1.3±0.08	0.10±0.03	0.1±0.20	0.20±0.19
Muscle	30.2±9.5	nd	108.1±35.6	0.36±0.10	3.8±0.12	0.05±0.06	1.0±0.21	0.21±0.19

Animals received 20mg/kg of [^{14}C] acetonitrile intraperitoneally, and the radioactivities in TCA-soluble and protein fractions of tissues were determined at 30 min, 4 hrs, and 4 and 7 days. ^a Trichloroacetic acid soluble fraction, ^b Protein fraction, ^c mean±SD, ^d not detected.

N18TG-2 および C6 細胞は、いずれも今回の培養条件では、培養開始後約 6～8 日間増殖を続け、その後細胞数が減少した。表 5 には N18TG-2 および C6 細胞にアセトニトリルまたは各種ニトリルを 6 日間作用させた後の ED_{50} を示す。N18TG-2 細胞に対して、クロロアセトニトリル、メタクリロニトリルなど 4 種のニトリルは ED_{50} が 5mM 以下の阻害作用を示したが、アセトニトリルでは 17.8mM (95%信頼区間 16.7～19.0mM)、その他の 5 種のニトリルは 6mM 以上であった。C6 細胞もクロロアセトニトリル、3-クロプロピオニトリルなどで比較的強く阻害されたが、

アセトニトリルを含む 6 種のニトリルでは ED_{50} は 20mM 以上であった。ニトリル類による細胞増殖阻害度は、両細胞間で有意の相関が認められなかった。図 1 (a, b) には N18TG-2 細胞の光顕像を、図 1 (c, d) には走査電顕像を示す。 ED_{50} に近い 15mM のアセトニトリルに 6 日間曝露された N18TG-2 細胞 (図 1, d) は走査電顕では非曝露細胞に比べて樹状突起の減少、細胞体の扁平化などの変化が認められた。

IV. N18TG-2 細胞培養系におけるアセトニトリルからのシアン遊離

アセトニトリルは N18TG-2 細胞で、他のニトリル類

Table 4. Level of radioactivity in tissues 7 days after repeated daily ip administration of [14 C]acetonitrile to rats

	Percent dose of administration per g body weight	
	TCA ^a	Protein ^b
Blood	3.4±0.64 ^c	2.0±0.15
Serum	4.7±0.46*	0.88±0.03
Lung	3.1±1.1	0.50±0.10
Liver	2.8±0.78	0.57±0.06
Kidney	3.2±0.31	0.90±0.22
Testis	1.9±0.61	0.30±0.04
Cerebrum	0.59±0.32	0.29±0.14
Cerebellum	0.84±0.28	0.33±0.11
Spinal cord	0.84±0.28	0.33±0.11
Muscle	0.63±0.40	0.36±0.02

Animals received intraperitoneally 3 mg/kg of [14 C]acetonitrile daily for 7 times, and the radioactivities in tissues were determined at 7 days after the last administration.

^aTrichloroacetic acid soluble fraction, ^bprotein fraction, ^cmean±SD (n=3), * $p<0.05$ vs 7 days after single dose of acetonitrile at 20 mg/kg (Table 3) by Welch's t-test (two sided).

Table 5. Effect of nitriles on viability of mouse neuroblastoma N18TG-2 and glioma C6 cells as presented by the concentration showing 50% inhibition (ED_{50})

Nitriles	ED_{50} (mM)	
	N18TG-2	C6
1. Acetonitrile	17.8	>22
2. Propionitrile	10.5	>20
3. 3-hydroxy propionitrile	>20	>20
4. n-butyronitrile	10.6	4.50
5. Allylnitrile	6.42	8.02
6. Chloroacetonitrile	1.56	0.43
7. 3-chloro propionitrile	3.60	4.34
8. Isobutyronitrile	6.20	>20
9. Acrylonitrile	3.26	>20
10. Methacrylonitrile	3.12	>20

N18TG-2 and C6 cells were incubated with each of the test nitriles at various concentrations at 37°C for 6 days. ED_{50} values were calculated by the least square method after the Probit transformation of the % viability of cells at each concentration.

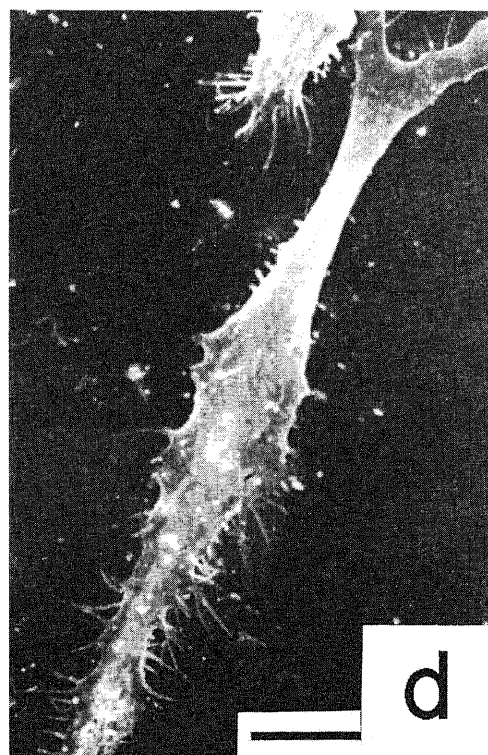
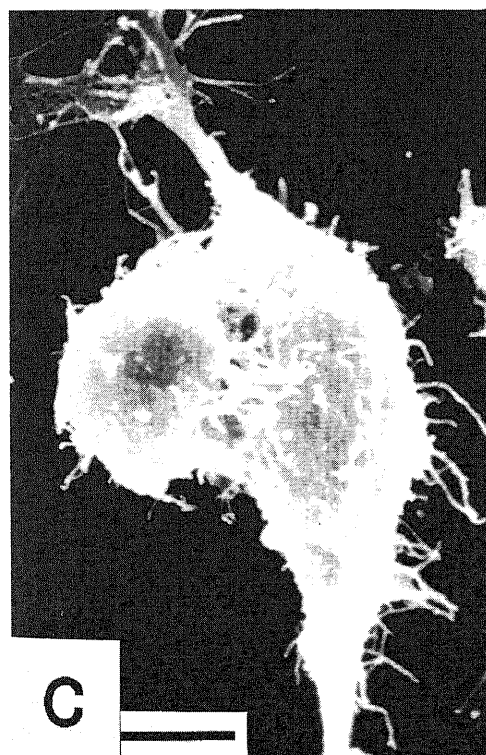
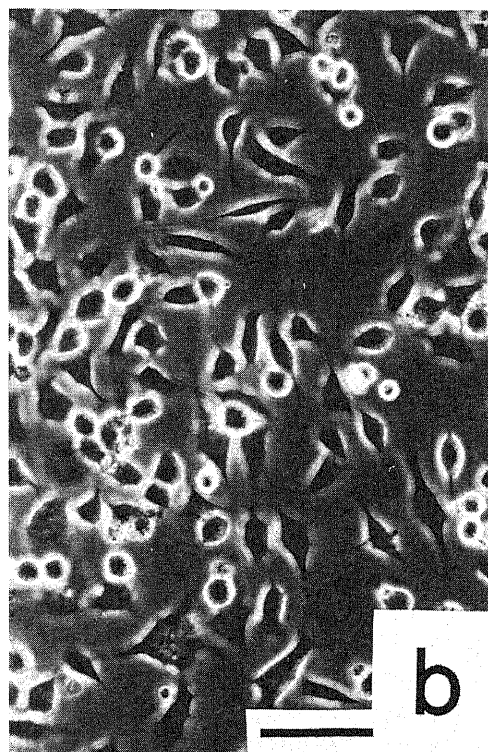
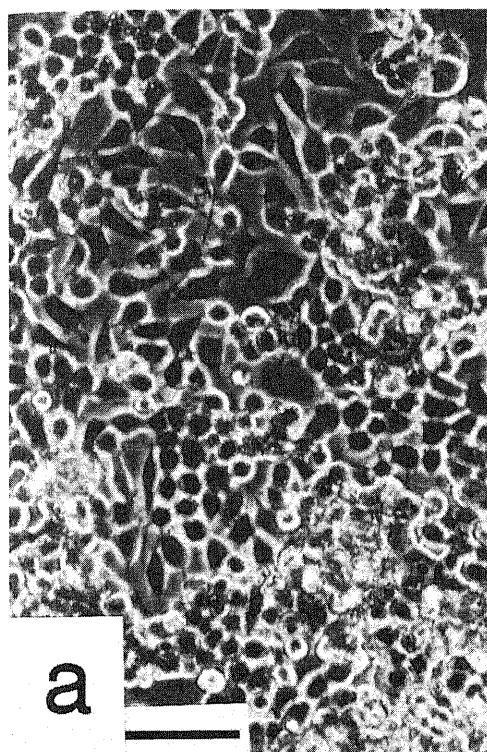


Fig. 1

と比較して弱いながらも増殖阻害作用を示したが、この作用が培養系におけるアセトニトリルからのシアンの遊離にもとづくかどうかを検討するため、6日間作用後の培地中のシアンを定量した。しかし、シアンは定量限界 ($0.1 \mu\text{g/ml}$) 以下であった。

V. N18TG-8 細胞のグルコースおよび蛋白代謝への影響

N18TG-2 細胞の6日間培養中のグルコース消費量および6日後の細胞内蛋白量を表6に示す。グルコース消費量はアセトニトリルの ED_{50} 量曝露群が対照群

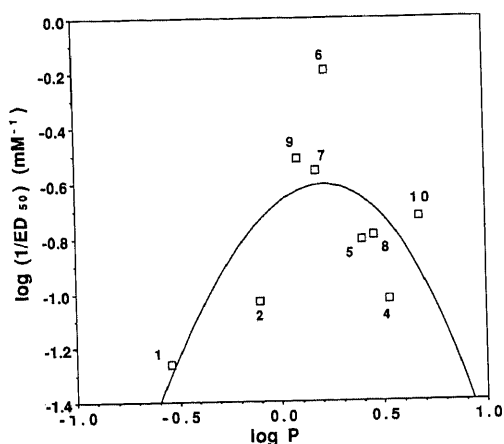


Fig. 2. $\log (1/\text{ED}_{50})$ of test nitriles on N18TG-2 cells vs their $\log P$. ED_{50} was calculated after a Probit transformation of the viability of cell exposed to various concentrations of nitriles for 6 days. The regression equation is as follows: $\log (1/\text{ED}_{50}) = -0.672 + 0.574 \log P - 1.22(\log P)^2 - 0.234(\log P)^3$ ($R^2 = 0.484$). Numbers in the figure correspond to those in Table 5.

に比べて有意 ($p < 0.05$) に増加したが、蛋白量は対照群と変わらなかった。

VI. ニトリル類の神経細胞毒性と油-水分配係数 ($\log P$)

アセトニトリルおよび8種のニトリルについて N18TG-2 細胞への増殖阻害作用とこれらの $\log P$ との関係を図2に示した。 $\log P$ と $\log (1/\text{ED}_{50})$ との間に $\log P$ 約0.2を頂点とする3次の関係が認められ、水溶性の極めて高いアセトニトリルはこの曲線上の左端に位置することが判った。

考 察

アセトニトリルは化学工業や実験室で広く用いられているが、同様に多用されている他のニトリル類、たとえばプロピオ、ブチロ、アクリロ、メタクリロニトリルなどに比べて、急性毒性は低いとされている¹⁰。このため従来アセトニトリルの毒性や生体影響に関する研究も比較的限られて来た。一方、この物質の用途が拡大し、これを取扱う機会が多くなっている現在、健康障害性に関する知見の蓄積が必要となっている¹¹。

一般に、ニトリル類は体内に入ると、まず肝ミクロゾーム中の P-450 を主とする薬物代謝酵素系の酸化作用によりシアンヒドリンとなり、シアンヒドリンは自動分解によりアルデヒドとシアンに分れる^{10,12}。ニトリル類の毒性の大部分または一部はこのシアンにもとづくと考えられている³。アクリロニトリルを用いた研究では、上記の代謝速度は動物の種類、生体への侵入経路などの条件に大きく左右される¹³。今回著者がアセトニトリルの代謝をマウスとラットで比較した成

Table 6. Effect of acetonitrile on glucose and protein metabolism of N18TG-2 cells

	Glucose consumption (mg/cell, $\times 10^{-7}$)	Protein content ($\mu\text{g/cell}$, $\times 10^{-7}$)
Control (3) ^a	1.05 ± 0.07	1.91 ± 0.16
Acetonitrile (3)	2.95 ± 0.87^b	1.81 ± 0.11

N18TG-2 cells were incubated with or without acetonitrile (17 mM) for 6 days at 37°C and 10% CO_2 . ^anumber of experiments, ^b $p < 0.05$ vs. control by Welch's test (two sided).

Fig. 1. Light and scanning electronmicrograph of N18TG-2 cells exposed to acetonitrile. (a) Light micrograph of normal N18TG-2 cells. Scale bar $10 \mu\text{m}$. (b) N18TG-2 cells exposed to 17 mM acetonitrile for 6 days. A decreased number in and degeneration of cells are seen. Scale bar $10 \mu\text{m}$. (c) Scanning electronmicrograph of a normal N18TG-2 cells. Scale bar $1 \mu\text{m}$. (d) A degenerated N18TG-2 cell after exposure to 17mM acetonitrile for 6 days. A decreased number in dendrites and flattening of the cell are seen. Scale bar $0.46 \mu\text{m}$.

績も同様であった。すなわち、体重当たり同量のアセトニトリルの経口投与で血中に検出されたシアン濃度はマウスではラットの約10倍であった(表1)。既報の研究では、アセトニトリルのマウスおよびラットでの経口 LD_{50} はそれぞれ約 260mg/kg³⁾ と 4,000mg/kg¹⁴⁾ で、マウスはラットの約15倍の感受性がある。この毒性の違いは、今回得られた両動物におけるシアン濃度の差によるところが大きいと考えられる。一方、同時に測定した大脳と肝臓中のシアン量は、他のニトリルの場合⁹⁾ とくらべて低いことが判った。このことは、既報⁴¹⁵⁾ の考え方と同様に、アセトニトリル分子または代謝の第2段階で作られるホルムアルデヒドの毒性も多少加わる可能性を示唆する。今回のマウスとラットで得られた成績から、人間でのアセトニトリルの毒性を推定することは必ずしも容易ではない。しかし現在化学工業界で広く用いられているアクリロニトリルについては、比較的豊富な動物実験や人間での中毒症例から、マウス、イヌ、人間が最も敏感で、この物質を取扱う人々の健康管理上でもこの知見を参考している⁹⁾。アセトニトリルに関してもこれに準ずるのが適切ではないかと考えられる。

放射性アセトニトリルを用いた生体内分布の研究は著者が最初である。この結果腹腔内に投与したアセトニトリルは投与量の多少に拘らず、組織中の酸可溶性分画に多く見出され、蛋白質との結合は比較的僅かであった(表2)。分布量の比較的多い臓器は血液、腎、肝、肺であった。その他の臓器では、これらより40～50%低いが、ほぼ均等に分布した。投与量を一定にして分布量の経時変化を調べると(表3)、投与後30分では血液中の酸溶性分画中の濃度が最大で、これは時間とともに急速に減少した。すべての臓器について7日後には24時間後の1/5またはそれ以下にまで減少した。蛋白分画中の放射能についても同様であった。7日間毎日繰り返して投与した場合も、最終投与の7日後には、1回投与の場合と同程度まで減少し、蓄積傾向はなかった。今回用いたアセトニトリルは $[1-^{14}C]$ 化合物で、測定した生体試料中の放射能には、遊離シアンおよびこれから生じたロダン由来のものが一部加わっている可能性があるが、大部分はアセトニトリルによるものと考えられる。今後は、 $[2-^{14}C]$ 化合物を用いてメチル基部分の分布および代謝を検索する必要がある。

一般に、ニトリル類には神経障害性を持つものが少なくない。例えば、アクリロニトリルは、末梢および中枢神経系の抑制作用が強い¹⁶⁾。フタロジニトリルは主として中枢神経系に作用し、人間では特異なてんか

ん発作などをおこさせる¹⁷¹⁸⁾。また、最近アリルニトリル、クロトノニトリルおよび2-ベンテンニトリルがマウスおよびラットに1回投与後各種の異常行動をおこさせ、この作用が中枢神経系におけるカテコールアミンおよびセロトニンの代謝異常によることが明らかにされている¹⁹²⁰⁾。

アセトニトリルについては既述の様に急性中毒とくに中枢神経症状の発生機序として遊離シアンの役割は明らかであるが、中毒時に体内に検出されるシアン量は、他のニトリル類にくらべて少ない⁹⁾。このことからアセトニトリル分子自体、またはシアン以外の代謝物たとえばホルムアルデヒドの作用が加わる可能性も考えられる。しかしこれらの作用を生体全体で検出することは必ずしも容易ではない。著者は今回、神経系に対する化学物質などの影響評価の際に多用される、マウス由来のニューロblastoma²¹⁾ およびラット由来のグリオーマ²²⁾ を用いて、その増殖に対する作用を指標として、神経障害作用を検討した。この結果、アセトニトリルは N18TG-2 に対して、比較に用いた各種ニトリル類よりは弱いが、 ED_{50} が 17.8mM の阻害作用を示した。一方、C6 に対しては ED_{50} が 20mM 以上であった。N18TG-2 細胞に対するアセトニトリルの阻害作用機序を知るために、培養液中のシアンを測定したが検出されなかった。これは神経細胞が一般に P-450 など薬物代謝酵素系に乏しい²³⁾ ことから理解出来る。また細胞内グルコース量および蛋白量に対する影響を検索したところ、蛋白量は無処理対照群と比べて有意差はなかったが、グルコースは有意に消費が増大した。この理由については現在明らかではないが、ニューロblastomaで低濃度のメチル水銀がグルタチオン代謝を増大させたという報告もある²⁴⁾。

アセトニトリルと比較に用いたニトリル類の油-水分配係数(logP)と、N18TG-2 細胞での $\log(1/ED_{50})$ との回帰分析²⁵⁾ で、両者間には logP が約0.2を頂点とする3次の関係が得られた。これは一般に脂肪族ニトリル類では水より油に約1.6倍の溶解性を持つ物質が、N18TG-2 細胞に最も強い阻害作用を及ぼすことを示している。一方、アセトニトリルのように、より水に溶け易い物質やメタクリロニトリルのように、より油に溶け易い物質では同細胞への阻害作用が低下する。一方、13種類の脂肪族ニトリルについて、logPとマウス経口 LD_{50} との回帰分析の結果²⁶⁾ でも、ここに近い関係が得られている。アセトニトリルの作用で変性した細胞の走査電顕像は正常細胞に比べて樹状突起が減少し、扁平な細胞に変化することを示した。この外的変化をもたらした細胞内部の変性状況について今後なお

検討が必要である。

結 論

各種の無機・有機化合物の溶剤、工業化学原料、クロマトグラフィーの溶出剤などとして広く用いられているアセトニトリルの生体作用を明らかにするため、動物の急性中毒時のシアン遊離量、アセトニトリルの生体内分布、培養神経細胞増殖への作用などを検討し、以下の結果を得た。

1. マウスおよびラットの同等量によるアセトニトリル急性中毒後の血中シアン量は、マウスがラットの約10倍であった。

2. 肝、脳中のシアン量は他のニトリル中毒時にくらべて少量であった。

3. $[1-^{14}\text{C}]$ -アセトニトリル 1 回投与後、放射能は主としてトリクロル酢酸可溶性分画に分布した。

4. 放射能の分布の多い組織は血液、腎、肝、肺などであった。その他の組織はこれより40~50%低い、ほぼ均等に分布した。

5. 放射能は投与後7日間で24時間後の1/5に減少した。

6. 7日間繰り返し投与後も同様の分布を示し、とくに組織中への蓄積性はなかった。

7. アセトニトリルのマウスニューロblastoma N18TG-2 細胞増殖への50%阻害度は17.8mMで、ラットグリオーマ C6 細胞に対しては20mM以上であった。

8. アセトニトリルを含む10種のニトリル類の油-水分配係数 $\log P$ と N18TG-2 細胞増殖阻害作用 $\log(1/\text{ED}_{50})$ との間には、 $\log P$ 約0.2を頂点とする3次の回帰式が得られた。

9. アセトニトリルは N18TG-2 細胞に細胞突起の減少、細胞体の扁平化をもたらした。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究の指導をいただいた恩師橋本和夫教授、実験上援助をいただいた谷井秀治講師、斎藤早苗先生をはじめ、衛生学教室の諸先生、培養細胞の走査電顕による観察に際して御援助をいただいた福井医科大学第2解剖学教室鳥越甲順助教授またタイプの労をいただいた出村千恵子さんに深謝いたします。

文 献

- 1) Smiley, R. A.: Nitriles. In Grayson (ed.), Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, Vol 15, 3rd ed. p 888-909, Wiley, New York, 1987.
- 2) Borman, S.: Acetonitrile shortage hurts

research laboratories. Chem. Eng. News, 68, 15 (1990).

3) Pozzani, U. C., Carpenter, C. P., Palm, P. E., Weil, C. S. & Nair, J. H.: An investigation of the mammalian toxicity of acetonitrile. J. Occup. Med., 1, 634-642 (1959).

4) Willhite, C. C. & Smith, R. P.: The role of cyanide liberation in the acute toxicity of aliphatic nitriles. Toxicol. Appl. Pharmacol., 59, 589-602 (1981).

5) Tanii, H. & Hashimoto, K.: Studies on the mechanism of acute toxicity of nitriles in mice. Arch. Toxicol., 56, 47-54 (1984).

6) Freeman, J. J. & HAYES, E. P.: Effects of acetone on microsomal metabolism of acetonitrile to cyanide. Toxicologist, 5, 246 (1985).

7) Tanii, H. & Hashimoto, K.: Influence of ethanol on the in vivo and in vitro metabolism of nitriles in mice. Arch. Toxicol., 58, 171-176 (1986).

8) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951).

9) Epstein, J.: Estimation of microquantities of cyanide. Anal. Chem., 19, 272-274 (1947).

10) 吉川 博: ニトリル化合物の毒性 1. 脂肪族ニトリル化合物. 医学と生物学, 77, 1-4 (1968).

11) National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH). In Criteria for a Recommended Standard: Occupation Exposure to Nitriles, DHEW (NIOSH) Publication p9, U. S. Government Printing Office, Washington DC, 1978.

12) Freeman, J. J. & HAYES, E. P.: The metabolism of acetonitrile to cyanide by isolated rat hepatocytes. Fundam. Appl. Toxicol., 8, 263-271 (1987).

13) IPCS: Acrylonitrile. In IPCS (ed.), Environmental Health Criteria, 28, p46-48, WHO, Geneva, 1983.

14) Smyth, H. F. & Carpenter, C. P.: Further experience with the range finding test in the industrial toxicology laboratory. J. Ind. Hyg. Toxicol., 30, 63-68 (1948).

15) Ahmed, A. E. & Farooqui, M. Y. H.: Comparative toxicities of aliphatic nitriles. Toxicol. Lett., 12, 157-164 (1982).

- 16) Hashimoto, K. & Kanai, R.: Studies on the toxicology of acrylonitrile. *Ind. Health*, **3**, 30-46 (1965).
- 17) 上田 久: フタロジニトリル中毒の衛生学的研究. *横浜医学* **11**, 1425-1456 (1961).
- 18) Nakamura, K., Ohyanagi, H. & Suzuki, A.: Histological studies on the rat brain in case of acute phthalodinitrile intoxication. *Kobe J. Med. Sci.*, **11**, 63-72 (1965).
- 19) Tanii, H., Kurosaka, Y., Hayashi, M. & Hashimoto, K.: Allylnitrile; A compound which induces long-term dyskinesia in mice following a single administration. *Exp. Neurol.*, **103**, 64-67 (1989).
- 20) Tanii, H., Hayashi, M. & Hashimoto, K.: Alteration in the metabolism of serotonin and dopamine in the central nervous system of mice displaying a persistent dyskinesia due to crotonitrile or 2-pentenitrile. *Arch. Toxicol.*, **64**, 231-236 (1990).
- 21) Vernadakis, A. & Davies, D. L.: Neural culture: A tool to study cellular neurotoxicity. *In* K. Blum and L. Manzo (eds.), *Neurotoxicology*, 1 ed., p559-583, Marcel Dekker, New York, 1985.
- 22) Ma, T. G., Ling, Y. H., McClure, G. D. & Tseng, M. T.: Effects of trifluoroacetic acid, a halothane metabolite, on C6 glioma cells. *J. Toxicol. Environ. Health*, **31**, 147-158 (1990).
- 23) Guengerich, F. P. & Mason, P. S.: Immunological comparison of hepatic and extrahepatic cytochrome P-450. *Mol. Pharmacol.*, **15**, 154-164 (1979).
- 24) Kromidas, L., Trombetta, L. D. & Jamall, I. S.: The protective effects of glutathione against methylmercury cytotoxicity. *Toxicol. Lett.*, **51**, 67-80 (1990).
- 25) Leo, A. J.: Hansch analysis & the use of partition coefficients. *In* I. M. Asher and C. Zervox (eds.), *Structure Correlates of Carcinogenesis of the Second FDA Office of Science Summer Symposium*. p55-62 FAD, Washington, 1977.
- 26) Tanii, H. & Hashimoto, K.: Studies on the mechanism of acute toxicity of nitriles in mice. *Arch. Toxicol.*, **55**, 47-54 (1984).

Toxicology of Acetonitrile-A Comparative Study with the Activity of Other Nitriles
Mitsuko Matsuki, Department of Hygiene, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920
-J. J. J. Med. Soc., **100**, 654-664 (1991)

Key words acetonitrile, toxicity, animals, neural cell cultures, mechanism

Abstract

Toxicity and its mechanism of acetonitrile (CH_3CN) were studied using mice, rats and cultured neural cells. After a single oral administration of a equimolar acetonitrile in mice and rats, the blood cyanide concentration in mice was about ten times higher than in rats. Thirty minutes after the rats received a single i.p. injection of [^{14}C]-acetonitrile the highest radioactivity was found in the blood, kidneys, liver and lungs followed by the cerebrum, cerebellum and spinal cord. The activity in the trichloroacetic acid-soluble fraction was more than ten times as high as in the protein fraction in all tissues. After 7 days, activity in both fractions decreased to one-fifth of that at 24 hours. After daily administration of [^{14}C]-acetonitrile for 7 days, the concentrations of tissue radioactivity were similar to those after a single administration and it had not accumulated in the tissues. The 50% inhibition dose (ED_{50}) of acetonitrile to the viability of mouse neuroblastoma N18TG-2 cells during 6 day incubation period was 17.8 mM (95% confidence interval: 16.7~19.0 mM), while that of rat glioma C6 cells was more than 20 mM. Chloroacetonitrile showed the smallest ED_{50} in both cell lines.

Acetonitrile increased the glucose metabolism of N18TG-2 cells but did not affect the protein metabolism. A parabolic relation was found between log P of 9 nitriles including acetonitrile and their log (1/ED₅₀), the peak of the curve being at 0.2 of log P value. Acetonitrile caused a decrease in dendrites and flattening of N18TG-2 cells during the 6 day incubation period.